

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN(11)Publication number : **04-045785**(43)Date of publication of application : **14.02.1992**

(51)Int.Cl.

**C12M 3/00
A61F 2/14
A61L 27/00
C12N 5/08**(21)Application number : **02-151419**(71)Applicant : **CENTRE REG TRANSFUSION SANGUINE DE
LILLE**(22)Date of filing : **08.06.1990**(72)Inventor : **HERVE BRORI
RONFARD VINCENT****(54) BIOLOGICAL SUBSTRATE FOR CELL CULTURE CONSTITUTED OF PLASMA PROTEIN COAGULATED FROM THROMBIN AND USE OF THE SAME IN PREPARING SUBSTANTIAL CELL CULTURE OF CORNEA, RECOVERING AND TRANSPORTING FOR PURPOSE OF TREATMENT**

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the subject substrate useful for substitution for destroyed skin, being coagulated with thrombin, obtainable by treating plasma with ethanol, comprising a coagulable fibrinogen, a factor VIII, a plasma fibronectin and a Ca thrombin for activating coagulation.

CONSTITUTION: This biological substrate comprises a mixture of a protein concentrate which is obtained by treating a human plasma with 10% ethanol solution at pH 7.2 at 4° C to give a precipitate, subjecting the precipitate to viral inactivation treatment, separating the precipitate by centrifugal separation, washing the precipitate, suspending the precipitate, adjusting the suspension to a proper ionic strength and freeze-drying the resultant substance, is coagulable with thrombin and is composed of a coagulable fibrinogen, a factor VIII and a plasma fibronectin and a calcium thrombin in an amount required to activate coagulation and is useful for cell culture.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

BEST AVAILABLE COPY

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許番号

特許第3134079号
(P3134079)

(45)発行日 平成13年2月13日(2001.2.13)

(24)登録日 平成12年12月1日(2000.12.1)

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

C 1 2 N 5/00

C 1 2 N 5/00

E

A 6 1 L 27/00

A 6 1 L 27/00

C

C 1 2 M 3/00

C 1 2 M 3/00

Z

請求項の数15(全 5 頁)

(21)出願番号 特願平2-151419

(22)出願日 平成2年6月8日(1990.6.8)

(65)公開番号 特開平4-45785

(43)公開日 平成4年2月14日(1992.2.14)

審査請求日 平成9年4月1日(1997.4.1)

(73)特許権者 999999999

サントル レジョナル ド トランスヒ
ュジオン サンギーヌ ド リル
フランス国 エフ-59012 リル リュ
カミーユ ゲラン19-21

(72)発明者 エルベ プロリィ

フランス国 エフ-59116 ウブリヌ
リュエル ド ラ ブランシュ 153

(72)発明者 ヴァンセン ロンファール

フランス国 エフ-59130 ランベルサ
ール アベニュー デュ マレシャル ル
クレルク 64

(74)代理人 999999999

弁理士 三枝 英二 (外2名)

審査官 嶋飼 健

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 トロンビンにより凝固した血漿蛋白質により構成された角化細胞培養物のための生物学的支持
体、並びに角化細胞培養物を調製し、回収し、治療目的のために移送することにおいて上記支持

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】 (1) 血漿をエタノールで処理することによって得られる、蛋白質1g当たり：少くとも0.9gの凝固性フィブリノーゲン、0.1IUの第XIII因子、及び0.03～0.1gの血漿フィブロネクチンを含む、トロンビン凝固性血漿蛋白質濃縮物と

(2) 可溶化した上記の蛋白質濃縮物に対して約10IU/mlの割合のカルシウム性トロンビン

との混合により形成されることを特徴とする、角化細胞の培養のための生物学的支持体。

【請求項2】 蛋白質濃縮物が、4℃の10%エタノール溶液による2回の連続的処理で、新鮮な血漿を沈殿させることにより得られることを特徴とする請求項1に記載の生物学的支持体。

【請求項3】 蛋白質濃縮物を凍結乾燥させることを特徴

とする請求項1又は2のいずれかに記載の生物学的支持体。

【請求項4】 蛋白質濃縮物をアプロチニン溶液に懸濁させることを特徴とする請求項1乃至3のいずれかに記載の生物学的支持体。

【請求項5】 添加物質として細胞増殖増強剤を含有することを特徴とする請求項1乃至4のいずれかに記載の生物学的支持体。

【請求項6】 添加物質として抗生物質を含有することを特徴とする請求項1乃至5のいずれかに記載の生物学的支持体。

【請求項7】 添加物質として創傷の治癒を促進する物質を含有することを特徴とする請求項1乃至6のいずれかに記載の生物学的支持体。

【請求項8】 直接的に回収可能で、移送可能で且つ移植

片として適用可能である置換組織 (replacement tissue) を形成できる胎児または成人ヒト角化細胞の培養物を作成することにおいて、請求項1乃至7のいずれかに記載の生物学的支持体を用いる方法。

【請求項9】培養皿において均一なフィルムを形成するように生物学的支持体の2種の成分を混合することを特徴とし、且つ培地中で角化細胞の懸濁液を該フィルムに接種することを特徴とする請求項8に記載の方法。

【請求項10】生物学的支持体の2種の成分を角化細胞の懸濁液と混合して、該細胞を次いで形成されるフィルムに組み込むことを特徴とする請求項8に記載の方法。

【請求項11】予め作成された新鮮な細胞層の分散の後、角化細胞懸濁液を得ることを特徴とする請求項9または10に記載の方法。

【請求項12】角化細胞が液体窒素に保存された細胞銀行から得られることを特徴とする請求項9または10に記載の方法。

【請求項13】ヒト (胎児または成人) 角化細胞の予め作成された培養物の回収および移送において、請求項1乃至7のいずれかに記載の生物学的支持体を用いる方法。

【請求項14】生物学的支持体の2種の成分が培養皿において予め作成された細胞層上で混合されることを特徴とする請求項13に記載の方法。

【請求項15】請求項1乃至7のいずれかに記載の生物学的支持体の作成のためにパッケージされることを特徴とする、トロンビンにより凝固できる蛋白質の濃縮物。

【発明の詳細な説明】

産業上の利用分野

本発明は、血漿蛋白質の濃縮物とトロンビンとの凝固した混合物からなる細胞培養物のための生物学的支持体、角化細胞の培養物の調製および再構成された表皮組織の形態での輸送における上記支持体の用途並びに上記角化細胞培養物の治療目的への適用に関する。

従来技術およびその問題点

バイオブシーから得られた数個の細胞に由来するヒト皮膚に類似する生きた皮膚または正常皮膚の生理機能を有している簡略化皮膚 (simplified skin) の実験室における再構成は、重篤な疾患 (遺伝性など) により損なわれるか或いは大きな火傷により破壊された皮膚を取り換える目的で、鋭意研究されている。

皮膚は、3種の重ね合わされた組織からなる複合型器官である。すなわち、表皮組織 (その内の85%は、身体を外部環境から隔離する不透過性角層を形成する角化細胞から構成される) ; 真皮組織 (主にコラーゲンから成る結合組織により分離された線維細胞などの細胞を有する) および真皮組織の下に在る皮下組織 (貯蔵脂肪になる細胞を含む) である。従ってこのような複合型器官の人工的再構成は、多くの問題を有する。インビトロで部分的に再構成された最初の組織は、真皮組織であり、ベ

ル (Bell) らにより為し遂げられた (Proc.Natl.Acad.Sci., 76, 1979, 1274)。

皮膚バイオブシーから始めて、線維芽細胞を最初は単層の形態で培養物中に作成することに成功した。次いで、コラーゲン (ラットの尾腱から抽出した) を含有する培地に懸濁させることにより、何度も継代培養した後、上記単層は、ゲルを形成し、3次元培養物を可能にする。このような培養物において、線維芽細胞は、正常真皮組織におけるのと同様に、コラーゲンのマトリクスと相互に作用し、それを組織化し、それを収縮させると考えることができる。インビトロで再構成されたこの組織は、“等価真皮組織 (equivalent dermis)” として公知である。数週間増殖させた後、機械的量の等価真皮組織を患者または負傷したヒドに移植するのに用いることができる。この移植は、ホストにより拒絶反応は起こらないものと考えられる。しかしながら、この等価真皮組織は、単なる一時的な手当てにすぎず、皮膚のバリア機能を修復することはできない。

更に、グリーン (H.Green) らは、角化細胞を長期間に亘って増殖させることができる方法および培地を開発した (Proc.Natl.Acad.Sci., 76, 1979, 5665)。この方法は、トリプシンで分散させた角化細胞を、致死的に放射線照射した線維芽細胞 (特に3T3細胞) の予め作成した単層 (この層は、栄養層としてもマトリクスとしても働く) に接種することによる。表皮組織は、急速に成長して、3〜5細胞の厚さの組織を形成する。この層を患者に移植し、インシチュで分化を続行させることができる。この方法を用いることにより重篤な火傷患者を治療することができることはすでに確証されている (ジー、ギャリコ (G.Gallico) ら、ニュー イングランド ジャーナル オブ メディシン (New England J.Med.), 311, 1984, 448)。

グリーンらの方法によれば、3週間の間に2cm²のバイオブシーから1m²の表皮組織を得ることができる。

移植片を作成するために再構成された細胞の回収は、尚も多くの技術上の問題点をかかえる。事実、酵素処理を利用し、細胞が互いに分離することなく、培養皿から細胞を引き剥がすことが必要である。この操作の間、細胞層の退縮が常に観察され、従って移植片表面積のある程度の減少が観察される。一旦、再構成された組織を分離すれば、該組織の移送および患者への移植を可能にする支持体に、該組織を固定しなければならない。ワセリン処理されたガーゼ包帯を通常用いる。上記のような操作は扱いにくく、時間を要する。

従って、移植された患者によりやがては再吸収されることができ、且つ細胞の取扱いを簡単にする新規な生物学的支持体ができれば使用することが非常に有益であると考えられる。更に、その有効性を確実にするためには、支持体またはその成分は、工業的プロセスによる製造および包装に適用することができなければならない。

問題点を解決するための手段

従って本出願人は、トロンビンで凝固できる血漿蛋白質の濃縮物および凝固を活性化するのに必要な量のカルシウム性トロンビンの混合物から成る細胞培養物用生物学的支持体を開発した。

トロンビンの存在下における血漿蛋白質の凝固は主に、血餅の形成を模倣する重合したフィブリン網目構造の形成のためである。細胞培養物の作成に適した支持体を形成するために、フィルム形成に適した条件で、特にペトリフラスコ中または細胞培養に適した他のフラスコ中で、凝固を実施する。

血漿蛋白質の濃縮物については、本願人により、欧州特許出願第884019613号に、示されている：血漿蛋白質は、4℃の10%エタノール溶液を用いる2度の連続的処理で新鮮な血漿を沈殿させることにより得られる。該濃縮物は、90%以上のフィブリノーゲン、および蛋白質1g当たり第XIII因子少くとも0.1IUおよびフィブロンectin 0.03~0.1gを含有する。該濃縮物は、包装され、凍結乾燥されて、使用するまで保存される。

また本発明は、トロンビンにより凝固できる蛋白質の濃縮物、特に細胞培養物のための生物学的支持体の作成のために包装された蛋白質濃縮物に関する。

使用時に、濃縮物を生理食塩水中または多価プロテアーゼ阻害物質、好ましくはアプロチニンを3000KIU/mlの濃度で含有する溶液中に再溶解させる。

凝固プロセスを活性化させて、細胞用の支持体として働くフィルムを形成させるために、カルシウムの存在または不存在下にトロンビンを加える。該プロセスは、トロンビンの作用によるフィブリノーゲンからフィブリンへの変換およびカルシウムイオンで活性化された第XIII因子の作用によりフィブロンectinを用いるフィブリン単量体の重合化を含む。

特に細胞培養物に適した本発明の支持体を形成するために、トロンビン濃度を好ましくは10IU/ml程度（この濃度は、上記の欧州特許出願第884019613号に記載される生物学的ニカワの場合のように、所望のコンシステンシーと異なる場合に用いられる濃度よりも遥かに低い濃度である）に調整する。

本発明の別の実施態様によれば、特にインビトロまたはインシチュで細胞増殖を促進し、従って移植後の創傷の治癒を促すように設計された種々添加物質を上記支持体中に混入することができる。

従って、上記支持体は、成長因子、特にEGF（表皮成長因子）など細胞増殖を促進する添加物質を含有することができる。

本発明支持体は、修復剤、抗生物質なども含有することができる。

本発明のフィルム状の支持体はその表面に層状（又は単層）に成長する細胞の培養に好適である。特に本発明のフィルム状の支持体はヒト角化細胞培養物を調製する

場合に特に有益である。これらの細胞は、患者から得られた皮膚バイオプシーに由来し、1/15~1/20の希釈で1~4回の継代を経た一次培養物であっても、液体窒素中に細胞銀行の形態で保存された細胞であっても良い。

融合的な層に作成されたこれらの角化細胞は、本発明の支持体にこれらを接種するときに、適当な培地中の懸濁液中でトリプシン化され、置換される。

本発明の生物学的支持体は、3種の異なる方法にて使用多される。

第1の使用方法によれば、生物学的支持体は、上記2種の成分を培養皿中で混合させることにより、フィルムの形態で製造される；角化細胞の懸濁液を適当な培地における該フィルムに接種する。角化細胞の培養物が融合性または半融合性になった時、該培養物は、培養皿からピンセットを用いて分離でき、且つガーゼなどの一時的支持体を用いる必要なく、そのまま患者に適用できる移植片として直接回収できる置換組織（replacement tissue）を形成する。このことは、作業時間の相当の短縮および成長した組織の100%の回収をもたらす。

本発明の支持体を用いる他の方法によれば、支持体の2種の成分を角化細胞の懸濁液と混合して、次に形成されるフィルム中にこれらの細胞を取り入れる。この方法によれば、上記の方法と同様にして、上記2種の成分を培養皿中の細胞懸濁液と混合して、移植片として使用することができる；この方法は、特に2~2.5barのベクターガス（窒素）を用いて生物学的支持体および角化細胞を吹き付けることにより、移植片を受けるように処理された患者の創傷に対して直接実施することができる。

本発明の支持体を用いる他の実施態様によれば、培養皿中に予め作られた角化細胞の細胞層上で上記2種の成分を混合して、細胞は、形成され、その結果、移植片として適用されるために剥離でき、移送できるフィルムで被覆される。

実施例

下記に実施例を示し、本発明を説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

実施例1—細胞培養物のための生物学的支持体の作成

細胞培養物のための生物学的支持体は、凝固性血漿蛋白質の濃縮物と凝固を活性化するのに必要な量のカルシウム性トロンビンとを混合することにより作られた。

A. 血漿蛋白質の濃縮物の調製

蛋白質濃縮物の調製は、本願人による欧州特許出願第884019613号に既に記載されている方法によった。即ち、寒冷沈降しないヒト血漿を用いて、pH7.2、温度4℃の10%エタノール溶液で2回続けて沈殿させた。2回の連続沈殿の間で、精製物にウイルス不活性化処理を実施した。遠心分離により沈殿物を上澄から分離し、4℃のエタノールで洗浄し、再度遠心分離した。沈殿物をトリス／クエン酸緩衝液の懸濁液中で置換し、蛋白質濃度を約35g/Lに調整し、蛋白質1g当たりの最終濃度が0.1~

0.2gとなるようにリジンを添加した。アルコールおよびクエン酸を除去するために透過ろ過 (diafiltration) し、イオン強度を調整した後、濃縮物をフラスコに詰め、凍結乾燥した。この蛋白質濃縮物は、蛋白質1g当たり、フィブリノーゲンを少くとも0.9g、フィブロンectinを0.03~0.06gおよび第XIII因子を0.15~0.30IU含有する。

B. 細胞培養物のための支持体の作成

上記の蛋白質濃縮物を、アプロチニンの存在または不存在に、3000KIU/ml (カリクレイン阻害物質単位/ml) の濃度で、水溶性懸濁液中で置換した。

この溶液を等容量のカルシウム性トロンビン (10IU/ml) と混合した。

直径10cmのペトリ皿について、蛋白質懸濁液2mlおよびトロンビン2mlを用い、これらの2種の溶液を、ミキシングカップリング (mixing coupling) により相互に連結された2つのシリンジを用いて同時に注入した。ペトリ皿を振盪して、均一に分散させ、そのまま15~20分間放置した。ペトリ皿を覆うフィルムが形成された。

培養皿は、“細胞培養物のために処理されていない”タイプのものであり、支持体が永久的に付着せず、従って次の回収を容易にすることを確実にする。

次いで、このフィルムを細胞培地で被覆した。フィルムの浸透圧が細胞の生理学的特性と両立する範囲内 (すなわち260~340mosM) に安定化するまで、上記の培地を数回取り替えた。

別の方法では、再構成された蛋白質濃縮物を、トロンビンと混合する前に、透析することができる。

実施例2—生物学的支持体上で角化細胞培養物を作成すること

患者の皮膚 (または胎児の細胞銀行を形成する胎児皮膚) から得られた皮膚パイオプシーによるグリーンらの古典的方法に従って得られた角化細胞の一次培養物を用いた。これらの一次培養物は、1/10希釈にて4~5回継代することができる。

融合性角化細胞の層をトリプシン化し、培地中の懸濁液に置換し、実施例1で得られた生物学的支持体のフィルムで覆われたペトリ皿に1/10希釈で接種した。

数時間後、細胞は、支持体に付着し、そこで正常に増殖して、3または4層の細胞層の厚さを有する融合性表皮組織のフラグメントを形成した。

フロントページの続き

(56) 参考文献 特開 平2-114 (JP, A)
米国特許4642120 (US, A)

再構成された表皮組織の上記のフラグメントは、支持体に付着しており、ピンセットを用いて培養皿から剥がして、移植片を受け入れるように整えられた創傷にそのまま適用することができる。

細胞が支持体に付着するので、他のタイプの培養物において用いなければならないワセリン処理ガーゼのような別の支持体に、再構成された表皮組織を付着させる必要が無い。このことは、作業時間を相当短縮させる。即ち、従来の方法では、4箱しか処理できなかったのに対して、40箱処理することができる。

更に、この支持体は、作業処理に良く耐え、引き剥がす時に収縮せず、培養物の細胞層の表面積を100%回復することができる。

実施例3—生物学的支持体を用いる再作成された細胞層の回収

グリーンの従来の方法に従って、致死的に照射された線維芽細胞の層で被覆されたペトリ皿中に角化細胞を接種した。

角化細胞のシートが融合性になり、数層の細胞層を形成した時に、培地を除去し、EDTA溶液を1.5時間に亘って添加し、PBSで2回洗浄した。次いで、実施例2の方法に従って、生物学的支持体を上記細胞層に直接注加した。

細胞を覆ってフィルムが形成すれば、前記の実施例と同様に、ピンセットを用いてフィルムを培養皿から剥離し、移植片として用いることができる。

実施例4—生物学的支持体への細胞の組み込み

蛋白質溶液のシリンジおよび角化細胞を含有するトロンビン懸濁液のシリンジを用意した。角化細胞は、新鮮なトリプシン化された培養物または液体窒素中に保存された細胞銀行から得ることができる。

上記の2つのシリンジをミキシングカップリングによって相互に連結し、角化細胞を含有する支持体をペトリ皿 (または移植を受ける創傷) に噴霧した; 細胞は、凝固の間フィルム中に保存された。噴霧は、ベクターガス (2~2.5barの窒素ガス) を用いて実施することができる。

この噴霧は細胞を変性せず、細胞層はインビトロの培養物中で修復されることが観察された。従って、上記の混合物を非常に薄い層で創傷に直接噴霧する場合、細胞は正常または殆んど正常に増殖する。

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

C12N 5/00 - 5/28

A61L 27/00

C12M 3/00 - 3/10

BIOSIS (DIALOG)

WPI (DIALOG)

(54)【発明の名称】 トロンピンにより凝固した血漿蛋白質により構成された角化細胞培養物のための生物学的支持体、並びに角化細胞培養物を調製し、回収し、治療目的のために移送することにおいて上記支持体を用いる方法

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.